

ヒト血清 Cationic Glutathione S-Transferase の Radioimmunoassay 法 とその肝疾患における臨床応用に関する研究

佐藤鉄典

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

Studies on the Radioimmunoassay of Human Serum Cationic Glutathione S-Transferase and Its Clinical Application in Liver Diseases

Tetsunori SATO

*Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. I. Urushizaki)*

Cationic Glutathione S-Transferase (GST) is a major group of soluble proteins in rat and human liver that catalyses the conjugation of glutathione (GSH) with a large group of compounds bearing an electrophilic center. Cationic GST catalyses the first step in mercapturic acid formation and therefore participates in cellular detoxification. To date six isozymes of cationic GST have been isolated from rat liver, and at least five isozymes have been reported from human liver. All isozymes reported so far from human liver are immunologically similar.

In the present study, cationic GST was purified from human liver by ion exchange chromatography, gel filtration and GSH-Lys-Sepharose affinity chromatography. Using this purified protein as antigen, specific antiserum was prepared in rabbits and a radioimmunoassay of human cationic GST was performed on various liver diseases.

1) The radioimmunoassay system for human cationic GST by the double antibody technique showed sensitivity and reproducibility adequate enough for most human serum samples of various liver diseases.

2) The cationic GST concentration of human healthy controls was 7.96 ± 1.80 ng/ml, whereas a marked increase was observed in acute hepatitis, fulminant hepatitis and chronic active hepatitis. A moderate increase was noted among cases of liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumor.

3) Serum cationic GST levels and serum transaminase activities were correlated in hepatitis and hepatocellular carcinoma.

4) In acute hepatitis, the appearance and disappearance of serum cationic GST was much faster than that of transaminases. Serum cationic GST measurements should provide unique information for the diagnosis and prognosis of acute liver diseases.

(Received January 12, 1984 and accepted January 30, 1984)

Abbreviations :

GST	: Glutathione S-Transferase	GPT	: Glutamic pyruvic transaminase
GSH	: Glutathione	GOT	: Glutamic oxaloacetic transaminase
RIA	: Radioimmunoassay	LDH	: Lactate dehydrogenase
CDNB	: 1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene	γ -GTP	: γ -glutamyl transpeptidase
BSA	: Bovine serum albumin	ZTT	: Zinc sulfate turbidity test
PBS	: Phosphate buffered saline	AFP	: Alpha-fetoprotein

Key words: Glutathione S-Transferase, Ligandin, Radioimmunoassay, GSH-Lys-Sepharose affinity chromatography

1 緒 言

Glutathione S-transferase(以下 GST と略記する)はbilirubinをはじめとする種々のligandと結合し肝組織などにおける色素担送の役割をになっている蛋白(Ligandin)として見い出された¹⁻⁴⁾。その後種々の親電子性化合物をGlutathione(以下 GSH と略記する)抱合し、最終的にmercapturic acidを合成して尿中、胆汁中へ排泄させる活性を有することが明らかとなり⁵⁾、現在では解毒酵素群の一つとして認識されている。

これまで GST には等電点電気泳動上 pI 8~9 に分布する数種(ヒトでは5種⁶⁾、ラットでは6種⁷⁾の isozyme の存在が知られてきたが、最近胎児肝より pI 4~5 域の GST (anionic GST) が発見されたことから⁸⁻¹⁰⁾ 前者は cationic GST と総称されるにいたった。この cationic GST は比較的研究の歴史が長く、また動物種を問わずあらゆる年齢の肝臓に豊富に存在する^{11,12)} ことから anionic GST に比べてその生理的機能、性状などの解析がすすんでいる。しかし液体中ことに血中での本蛋白の動態についてはあまり詳細な検討がなされておらず、わずかに Adachi *et al.*¹³⁾ がヒト血清中の本酵素の活性を測定し、肝障害の一部に有意な上昇を認め、また Bass *et al.*¹⁴⁾、Arias *et al.*¹⁵⁾ がラット血中の本蛋白を Radioimmunoassay (以下 RIA と略記する)法により測定し、実験的肝障害や担癌状態での増加を報告しているにすぎない。

本研究ではヒト cationic GST の RIA 法を確立し各種肝疾患患者の血中 cationic GST 測定の臨床診断的意義を検討したので報告する。

2 研究対象および方法

2.1 研究対象

札幌医科大学第4内科およびその関連病院で、血液生化学検査と肝生検で診断した各種肝疾患患者110例(急性肝炎27例、劇症肝炎3例、慢性肝炎23例、肝硬変19例、肝細胞癌17例、転移性肝腫瘍11例、輸血後肝炎10例)さらに肝機能検査上特記すべき異常の認められなかった健常者93例(男性45例、女性48例)の総計203例を測定対象とした。

採血は早朝空腹時におこない血清を分離して一部をGPT、GOTなどの肝機能検査に、他を-70℃に保存し血清 cationic GST の測定に用いた。

2.2 研究方法

2.2.1 ヒト肝 cationic GST の抽出法

ヒト肝 cationic GST の抽出は Fig. 1 に示す方法で実施した。操作はすべて4℃でおこなった。死後3時間以内の病理解剖で得た正常肝臓組織に3倍量の0.25 M sucrose を含む0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 を加え、肝をハサミで細切した後に Polytron blender (Kinematica Co.) で3分間ホモジナイズした。同ホモネートを DAMON 社製 IEC-B-20 A 型遠心機で10,000×g, 4℃, 30分間遠心し、最上層の脂肪および最下層の核、不溶性物質を含む沈殿物を除き中間層を分離して集めた。次いでこの中間層を日立工機の70 P-73 type 超遠心機を用い105,000×g, 4℃, 2時間遠心をおこなった。上清を肝可溶性分画とし0.01 M Tris HCl buffer, pH 8.0 中で4℃, 24時間透析した後あらかじめ同緩衝液で平衡化してある DEAE セルロース (Whatman Co.) カラム (2.6×20 cm) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄し、通過した分画について2・2・4で述べる方法で GST 活性を調べ、活性のあるピークを集めた。この分画を85%飽和硫酸アンモニウムで塩析した後、沈殿物を10%グリセロールを含む0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 に溶解し同緩衝液を用い Sephadex G-75 (Pharmacia Co.) カラム (2.5×100 cm) でゲル濾過を実施し、流速15 ml/hr で各分画4.2 ml ずつ採取した。溶出された各分画の GST 活性を測定し活性のあるピークを集め粗 cationic GST とした。次に Inoue *et al.*¹⁶⁾ にしたがって Sepharose-6 B (Pharmacia Co.) を臭化シアン(和光純薬)で活性化した後、L-Lysine(片山化学)をスパーサーとして GSH (SIGMA Co.) を結合させ作製した GSH-Lys-Sepharose アフィニティカラム (3×15 cm) に粗 cationic GST 分画を添加した。添加後カラムを0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 で洗浄した後0.01 M GSH を含む1 M Tris, pH 8.0 溶液で cationic GST を溶出した。

2.2.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

Sodium Dodecyl Sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は Maizel¹⁷⁾ に準じた。分離用ゲルのアクリルアミド濃度を10.5%, 調整用ゲルを3.0%とし、分離用ゲル緩衝液には0.2 M Tris HCl, pH 8.8 を、調整用ゲル緩衝液には0.0625 M Tris HCl, pH 6.8 を、電極槽緩衝液には0.1% SDS を含む

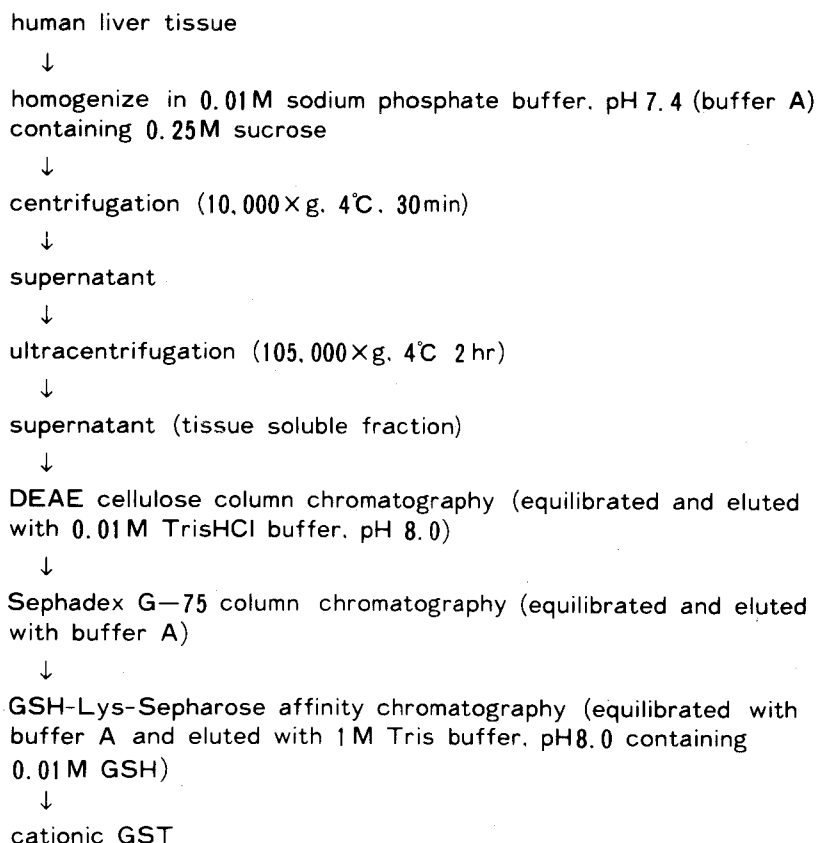


Fig. 1 The method for purification of cationic GST.

0.005 M Tris-glycine, pH 8.8を用いた。泳動装置は $0.2 \times 13 \times 13$ cm のスラブゲル電気泳動装置(和科盛商会)を用いた。試料は $200 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ を試料用緩衝液 [0.0625 M Tris HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.02 M 2-mercaptoethanol (2-ME), 20%グリセロール] と等量に混合した後, 100°C , 3分間加熱したうえ, その $0.05 \sim 0.1$ ml をとり試料溝に添加し, 30 mA, 3時間, 室温で泳動した。

cationic GST の分子量は牛血清アルブミン(BSA), オブアルブミン, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor (いずれも Pharmacia Co.) を標準蛋白として Maizel¹⁷⁾ の方法により相対易動度から算出した。

2.2.3 Folin-Lowry 法

精製 cationic GST の蛋白量は Folin-Lowry 法¹⁸⁾ により定量した。蛋白標準溶液として BSA を用いた。

2.2.4 GST 活性測定法

GST 活性の測定は Habig *et al.*¹⁹⁾ にしたがった。基質として 1.0 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (以下 CDNB と略記, 東京化成), 1.0 mM 還元型 GSH を

含む 0.99 ml の 0.1 M potassium phosphate, pH 6.5 中に 0.01 ml の試料を加えすばやく攪拌し, 25°C , 340 nm での吸光度変化を分光光度計 (島津, UV 200) で測定した。各抽出段階で得られた試料の GST 活性は CDNB の分子吸光係数 ($\Delta\epsilon$) が 9.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であることから¹⁹⁾, 1分間の吸光度変化を $\Delta O.D$ 340nm/min とあらわし
$$\frac{\Delta O.D \ 340\text{nm/min}}{9.6}$$

$$\times \frac{1(\text{セル中反応液容量, ml})}{0.01(\text{試料容量, ml})} (\mu\text{moles/min/ml})$$

の式を用いもとめた。なお Folin-Lowry 法¹⁸⁾ から得られた酵素蛋白量で上記の式を除いたものを比活性 ($\mu\text{moles/min/mg}$) として表わした。

2.2.5 Radioimmunoassay 法

2.2.5.1 抗ヒト肝 cationic GST 抗体の作製

抗ヒト肝 cationic GST 抗体の作製は Marcus and Zinberg²⁰⁾ に従った。cationic GST $100 \mu\text{g}/0.5$ ml と Freund 完全アジュバンド 0.5 ml を注射筒内でよく混じエマルジョンとした後, 家兎(雄 $4 \sim 6$ カ月)の両足

臍皮下におのおの0.1 ml, 背部皮内に0.8 ml を20~40カ所接種した。初回注射後2週間毎にブースター注射をくり返し, 6週後頸動脈より全採血をおこない抗血清を得た。

2・2・5・2 免疫二重拡散法

免疫二重拡散法は Ouchterloney²¹⁾ に従い, 1% アガロース, borate buffer, pH 8.4 中で抗原濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ とし, 37°C で一昼夜インキュベートし, 沈降線を確認した。

2・2・5・3 ^{125}I 標識 cationic GST の作製

Na ^{125}I (第1ラジオアイソトープ社) を用い Hunter-Greenwood²²⁾ の方法により cationic GST を標識した。精製 ヒト cationic GST 10 $\mu\text{g}/0.0085\text{ ml}$ (0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) を 0.05 ml の 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 に溶解し, Na ^{125}I 1 m Ci を加え更にクロラミン T 0.01 ml (15 mg/10 ml in 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) を加えた。室温で 60 秒間軽く振盪した後, メタ重亜硫酸ナトリウム 0.05 ml (20 mg/10 ml in 0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) および IM ヨウ化カリウム 0.005 ml を加え標識操作を終えた。

2・2・5・4 ^{125}I 標識 cationic GST と遊離 ^{125}I の分離

両者の分離は Sephadex G-25 (Pharmacia Co.) を用いたゲル濾過によった。Sephadex G-25 をあらかじめ 0.02 M Tris HCl, pH 8.0, 0.01 M ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1 M 塩化ナトリウム (TEN buffer) で膨潤後 0.8×12.5 cm のカラムを作製し TEN buffer, 2.0% BSA 含有 TEN buffer, 0.1% BSA 含有 TEN buffer で順次カラムを洗浄した。試料を添加後 0.1% BSA 含有 TEN buffer で溶出し, 1 ml ずつを分画採取した。各分画の 0.01 ml ずつをガンマー・カウンター (LKB 社, Wallac 1280) で放射活性を測定した。放射活性の最初のピークすなわち ^{125}I 標識 cationic GST 分画をプールした後 1% 牛血清アルブミン含有の 0.01 M sodium phosphate, pH 7.2, 0.15 M sodium chloride (1% BSA-PBS) で 40,000 c.p.m./0.1 ml になるよう希釈をおこない RIA に用いた。

2・2・5・5 測定法

測定は 2 抗体法によった。RIA 用プラスチック試験管 (10×70 mm) に 1% BSA-PBS を 0.75 ml ずつ分注し, 40,000 c.p.m./0.1 ml に調整した ^{125}I 標識 cationic GST 溶液 0.05 ml および GST 標準溶液 (1~20,000 ng/ml) または測定試料 0.1 ml, および希釈抗ヒト cationic GST 血清を 0.1 ml 加え, 4°C で 24 時間振盪させ第 1 次反応をおこなった。次に Bound (B) と Free

(F) の分離をするため, 希釈正常家兔血清 0.1 ml および希釈抗家兔 γ -グロブリンヤギ血清を 0.1 ml 加え, 4°C, 24 時間第 2 次反応をおこなった。反応終了後, 各試験管に 1 ml の 1% BSA-PBS を加え 3,000 r.p.m. 30 分間遠心し, 上清を捨て試験管内面の水分を濾紙で吸収したうえ, 沈殿物の放射活性を測定した。1 検体について, おのおの 2 本の試験管で測定をおこない, 各試験管の測定時間は 1 分間とした。測定値は, 標準溶液または試料測定値 (B), cationic GST 未添加測定値 (Bo), 抗ヒト cationic GST 抗体未添加の試料による非特異的沈降測定値 (NS) より (B-NS)/(Bo-NS)×100 の式を用い % bound として表わした。

3 結果

3・1 ヒト肝 cationic GST の抽出

3・1・1 各抽出過程におけるクロマトグラフィパターン

肝可溶性分画を添加した DEAE セルロースによるイオン交換クロマトグラフィの溶出パターンを Fig. 2-A に示した。カラムを通過した蛋白は一峰性を示し, GST 活性もそのピークに一致した。次に施行した Sephadex G-75 によるゲル濾過では Fig. 2-B に示すようにフラクション 70~90 のピークに GST 活性を認めた。この分画を GSH アフィニティカラムに添加し, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 で洗浄後, 0.01 M GSH を含む 1 M Tris, pH 8.0 溶液で溶出される Fig. 2-C のフラクション 67~83 を精製 cationic GST とした。

精製後の cationic GST の分子量を測定するため本蛋白を Pharmacia Co. の標準蛋白とともに Sephadex G-75 でゲル濾過をしたところ, Fig. 2-D に示すように活性部位は 46,000 dalton となり Arias *et al.*¹⁻³⁾ の報告に一致した。

3・1・2 精製 cationic GST の SDS-PAGE 所見

精製ヒト肝 cationic GST の純度は SDS-PAGE で検定した。Fig. 3 は本蛋白抽出過程の SDS-PAGE による所見である。GSH アフィニティクロマトグラフィ後の分画には分子量 23,000 の部位に単一のバンドが認められ, 精製 cationic GST は純粋であると判定された。なお, この単一のバンドは, ゲル濾過法 (Fig. 2-D) による本蛋白の分子量の $\frac{1}{2}$ であるため monomer (subunit) を示しているものと考えられた。

3・1・3 精製 cationic GST の酵素活性

精製された cationic GST の比活性は 14.9 $\mu\text{ moles/min/mg}$ であった。(Table 1)

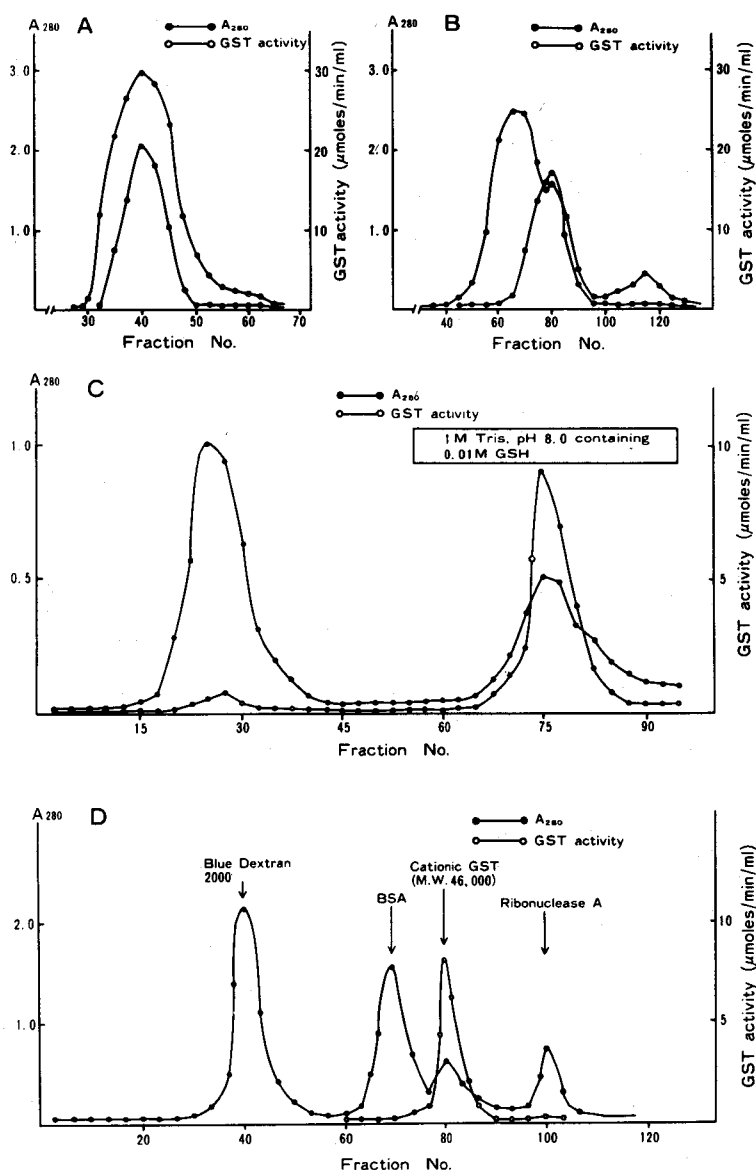


Fig. 2 Purification of human cationic GST. Elution profiles of protein concentration and GST activity with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene and GSH as substrates.

(A) DEAE cellulose chromatography

(B) Sephadex G-75 gel filtration

(C) GSH affinity chromatography

(D) Rechromatography by Sephadex G-75 to estimate the molecular weight

3.2 2 抗体法による RIA の基礎的検討

3.2.1 免疫二重拡散法による抗ヒト肝 cationic GST 家兔血清の分析

作製した抗ヒト肝 cationic GST 家兔血清は Fig. 4

に示すように Ouchterloney 法で、精製した cationic GST のみ沈降線を形成し、ラット肝 cationic GST, ヒトアルブミン、正常人血清とは反応しなかった。抗体の力価は同じく Ouchterloney 法で中心ウェルにヒト

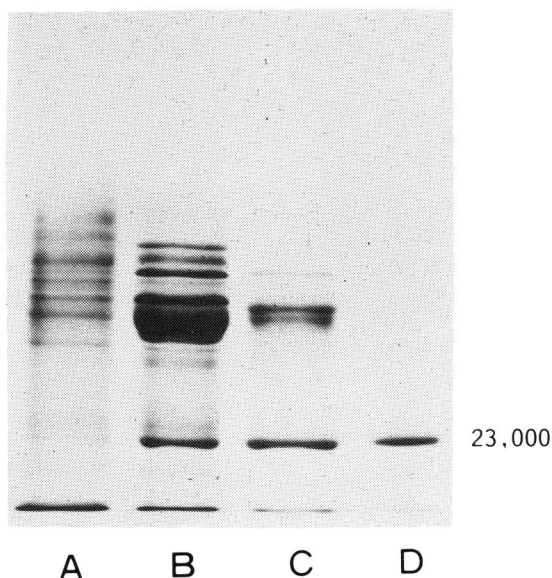


Fig. 3 SDS-PAGE of human cationic GST at various stages of purification.

A : liver 105,000×g supernatant.

B : the fraction after DEAE-cellulose chromatography.

C : the fraction after Sephadex G-75 gel filtration.

D : the fraction after GSH affinity chromatography (purified cationic GST, M. W. 23,000).

肝 cationic GST 溶液(200 μ g/ml)をおいた際、16 倍希釈まで沈降線を形成した。

3・2・2 125 I 標識 cationic GST の放射比活性およびその純度

125 I 標識 cationic GST の放射比活性は 68.1 μ Ci/ μ g protein であった。 125 I 標識 cationic GST 0.2ng と cationic GST 20 μ g を混和し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなったところ放射活性は Fig. 5 に示すように Coomassie brilliant blue R-250 (BIO-

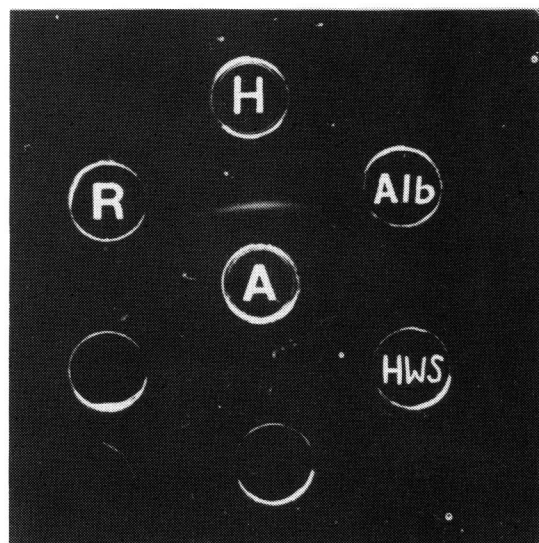


Fig. 4 Ouchterloney double immunodiffusion pattern.

A : Anti human cationic GST serum.

H : Human cationic GST.

R : Rat cationic GST.

Alb : Human serum albumin.

HWS : Human whole serum.

RAD) により染色されたバンドと一致し、ヨード化による易動度の差を認めなかった。

3・2・3 抗ヒト肝 cationic GST 抗血清の最適希釈倍数

抗ヒト肝 cationic GST 家兔血清の最適希釈倍数を決定するため抗血清を 100 倍から 32,000 倍まで希釈し 125 I 標識 cationic GST との結合率を検討した。その結果を Fig. 6 に示したが、1,000 倍希釈で 50% の結合率がみられ、以後のアッセイにはこの希釈倍数を用い

Table 1 Purification of cationic glutathione S-transferases from human liver.

Fraction	Volume (ml)	Total activity (μ moles/min)	Specific activity ^a (μ moles/min per mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Liver supernatant	320	282.11	0.058	—	100
DEAE-cellulose	56	192.19	0.512	8.8	68
Sephadex G-75	88	142.50	1.154	19.9	51
GSH affinity chromatography	51	33.85	14.9	256.9	12

^aActivity measured at 25°C and pH 6.5 using 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 1 mM GSH as substrates. Protein determined by the method of Lowry *et al.*¹⁸⁾

た。

3・2・4 標準曲線

Fig. 7 に示すように 5~1,000 ng/ml まで満足すべき直線性が得られた。Zero point の放射活性との間に 95% の信頼度をもって有意差を認める濃度、すなわち測定感度は 5 ng/ml であった。

3・2・5 血清希釈の影響

血清希釈の影響を知るために異なった 4 検体を倍数希釈した。Fig. 8 に示すように 2~8 倍希釈まで直線性を示した。

3・2・6 Intraassay および Interassay variation

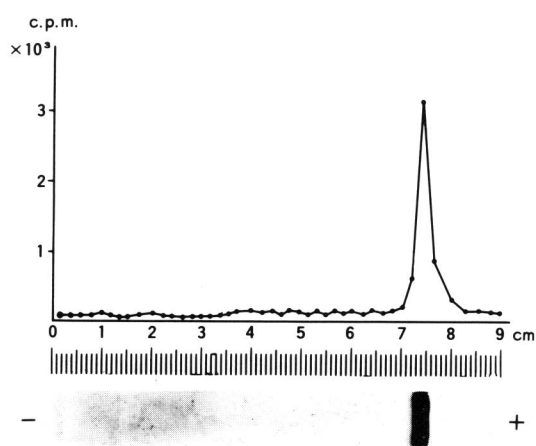


Fig. 5 Behavior of ^{125}I -labelled cationic GST in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

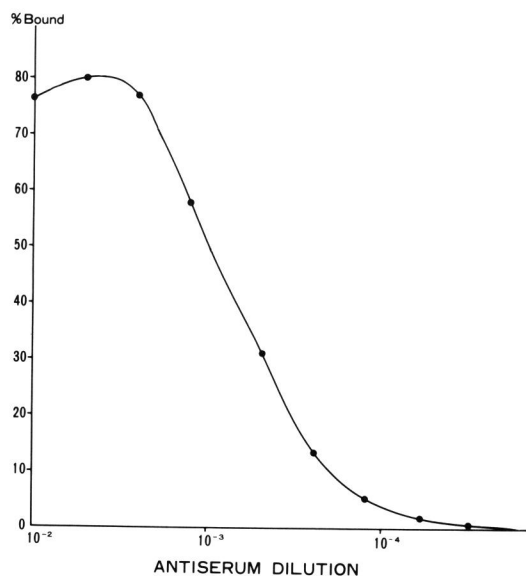


Fig. 6 Titration of antiserum to iodinated cationic GST.

Intraassay では 4 検体について同時に 10 回測定し C. V. (変動係数) を算出した。Table 2(a) に示すように C. V. は 3.6~9.2% といずれも 10% 以下であったが、cationic GST 値が 10 ng/ml 以下の範囲でやや大きくなる傾向がみられた。

Interassay では 4 検体を duplicate で測定日を変えて 3 回ずつ測定した。結果を Table 2 (b) に示したが、そ

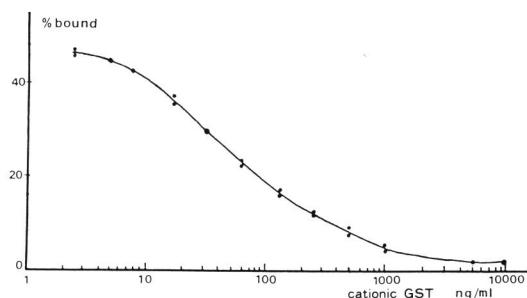


Fig. 7 Standard curve for RIA of cationic GST.

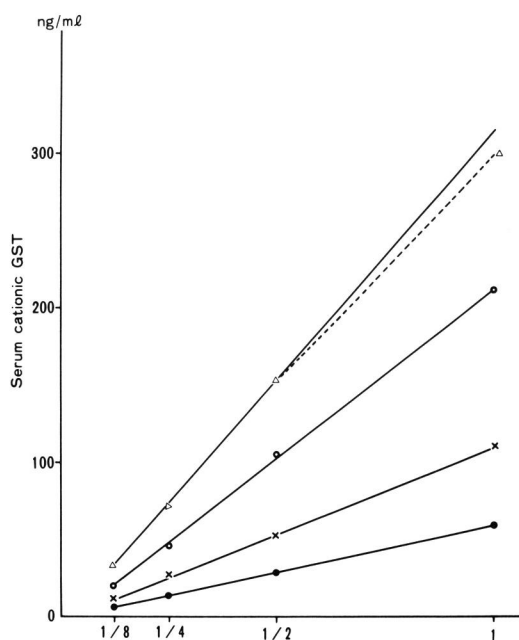


Fig. 8 Assay of serum cationic GST concentrations in successive dilutions of various serum samples.

の C. V. は 8.4~13.9% と Intraassay に比べやや大きく、測定値が小さくなるにしたがい増加がみられた。

3.2.7 回収試験

アッセイ系に精製された cationic GST を 25, 50, 100, 250, 500 ng 添加し、添加後の cationic GST 値を測定した。その回収率を Table 3 に示したが、88.4~104.4% で平均 93.3% であった。

3.3 血清 cationic GST 値測定成績

3.3.1 正常対象群

6 歳から 92 歳にわたる健康な男女 93 例の RIA 法による血清 cationic GST 値の測定結果を Fig. 9 に示した。測定値は 5.2~12.7 ng/ml に分布し平均 7.96 ± 1.80 ng/ml ($n=93$) であった。男子は 8.13 ± 1.70 ng/ml ($n=45$)、女子は 7.79 ± 1.87 ng/ml ($n=48$) で男女間に有意差はなかった。年齢別による血清 cationic GST 値の差異を調べるため、正常対象群を① 19 歳以下、② 20~49 歳、③ 50 歳以上の 3 群に分けて測定したが、Fig. 10 に示したように①群は 8.26 ± 1.86 ng/ml

Table 2 (a) Intraassay variation.

Sample	No.	Mean \pm S. D. (ng/ml)	C. V. (%)
A	10	5.7 ± 0.5	9.2
B	10	85.8 ± 3.1	3.6
C	10	116.8 ± 7.7	6.6
D	10	232.2 ± 15.8	6.8
mean			6.6

Table 2 (b) Interassay variation.

Sample	No.	Mean \pm S. D. (ng/ml)	C. V. (%)
E	3	6.6 ± 0.9	13.9
F	3	61.3 ± 7.7	12.6
G	3	168.3 ± 18.1	10.7
H	3	233.3 ± 19.6	8.4

C. V. : coefficient of variation mean 11.4

Table 3 recovery test.

added cationic GST (ng/tube)	measured cationic GST (ng/tube)	calculated cationic GST (ng/tube)	recovery (%)
0	36.4		
25	56.5	61.4	92.0
50	76.4	86.4	88.4
100	118.0	136.4	86.5
250	272.0	286.4	95.0
500	560.0	536.4	104.4
mean			93.3

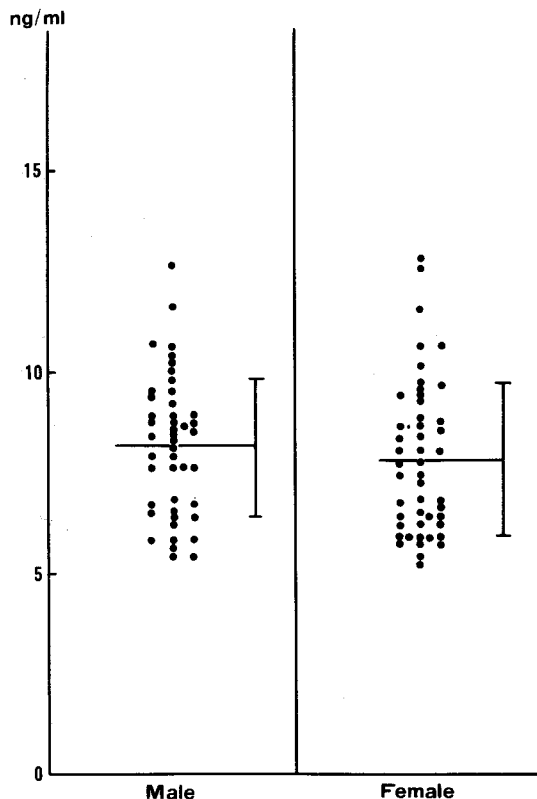


Fig. 9 Serum cationic GST concentrations in normal males and females.

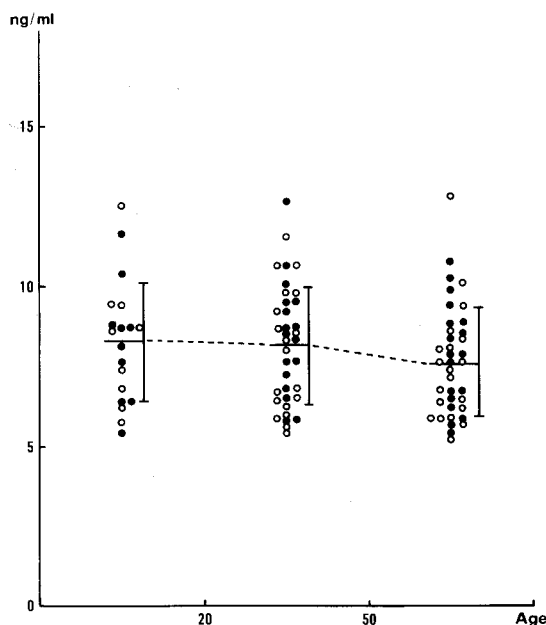


Fig. 10 Alteration in serum cationic GST levels with aging. Solid circles represent values for males and open circles represent values for females.

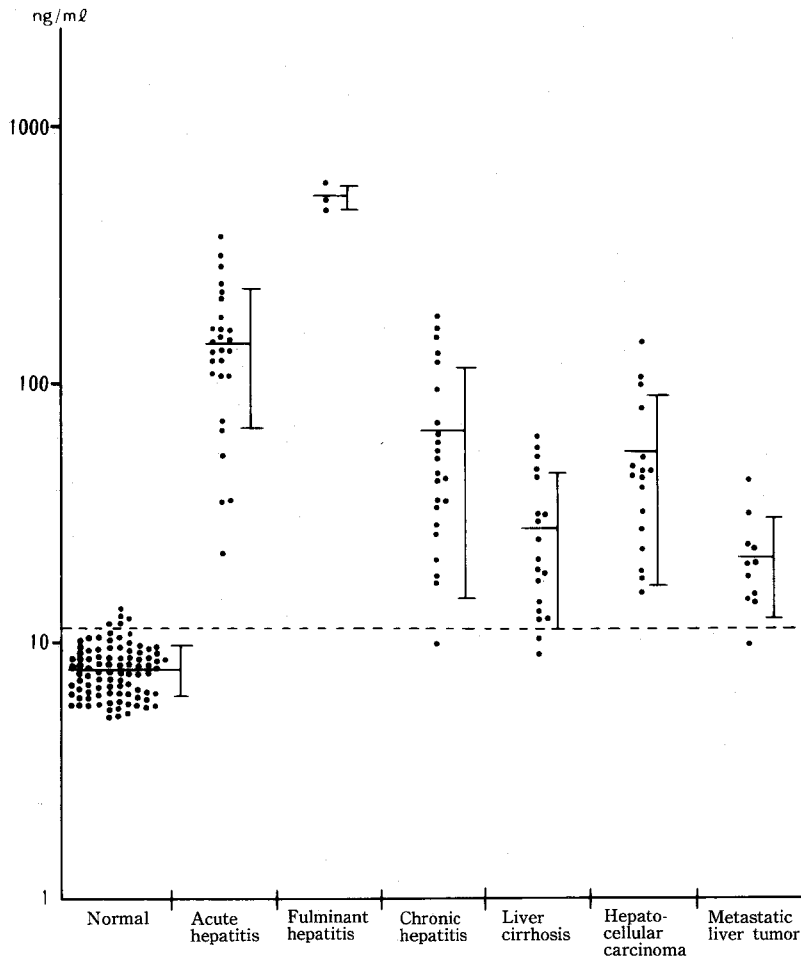


Fig. 11 Serum cationic GST concentrations of patients with liver disease. The dotted line indicates the upper limit of normal values (11.5 ng/ml >).

($n=19$), ②群は 8.14 ± 1.82 ng/ml ($n=36$), ③群は 7.63 ± 1.69 ng/ml ($n=38$) と統計上有意差は認められなかった。以上より mean ± 1.96 S. D. の 11.48 ng/ml を正常値の上限とした。

3.3.2 各種肝疾患における血清 cationic GST 値

Fig. 11 に示したように急性肝炎 27 例では、22.0~380 ng/ml と広く分布し、平均 151.58 ± 84.86 ng/ml と高値を示した。劇症肝炎 3 例では 536.67 ± 54.36 ng/ml と異常高値を示した。慢性肝炎 23 例では 14.6~185 ng/ml に分布し、平均 66.32 ± 49.52 ng/ml であった。慢性肝炎 23 例のうち 12 例に肝生検を施行したが、非活動性肝炎 6 例、活動性肝炎 6 例であり、血清 cationic GST 値は非活動性で 35.27 ± 10.94 ng/ml、活動性では 127.8 ± 44.04 ng/ml と両者に有意差を認めた ($P < 0.01$)。肝硬変症 19 例では 12.0~62.5

ng/ml に分布し、平均 28.72 ± 16.56 ng/ml であった。肝細胞癌 17 例では 15.8~152 ng/ml に分布し、平均 54.44 ± 37.35 ng/ml であった。また転移性肝腫瘍 11 例では平均 21.91 ± 8.99 ng/ml であった。

3.3.3 各種肝機能検査との比較検討

各種肝疾患における血清 cationic GST 値と肝機能検査値との相関を Table 4 に示した。急性肝炎では、GPT, GOT と cationic GST 値はよく相関し、GPT との相関係数が 0.89 ($P < 0.01$)、GOT では 0.76 ($p < 0.01$) と有意の相関を認めたが、総ビリルビン値、ZTT, γ -GTP との間には相関が認められなかった。慢性肝炎では急性肝炎に比し相関は低下するも GPT, GOT との間に危険率 1% 以下で有意の相関を認めた。ことに活動性の慢性肝炎では GOT で $r=0.85$ と非活動性に比べ明らかに相関が上昇する傾向がみられた。肝硬変では

Table 4 Correlation coefficients between serum cationic GST and other liver function tests.

	GPT			GOT			Total bilirubin			ZTT			γ -GTP		
	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p
Acute hepatitis*	30	0.89	<0.01	30	0.76	<0.01	17	0.13	NS	11	0.12	NS	8	0.07	NS
Chronic hepatitis	23	0.68	<0.01	23	0.62	<0.01	16	-0.27	NS	13	-0.14	NS	16	0.20	NS
inactive hepatitis	6	0.20	NS	6	0.48	NS									
active hepatitis	6	0.72	NS	6	0.85	<0.05									
Liver cirrhosis	19	0.11	NS	19	0.016	NS	15	-0.34	NS	19	-0.65	<0.01	13	0.23	NS
										LDH			AFP		
										n	r	p	n	r	p
Hepatocellular carcinoma	17	0.75	<0.01	17	0.79	<0.01	16	0.32	NS	13	0.42	NS	17	0.24	NS
Metastatic liver tumor	11	0.35	NS	11	0.27	NS	18	0.05	NS	10	-0.29	NS	11	0.10	NS

NS: not significant ($p>0.05$)

* : including 3 samples of fulminant hepatitis.

GPT, GOT, 総ビリルビン, γ -GTP との間に相関は認められないが, ZTT との間に $r = -0.65$ と負の相関が認められた。肝細胞癌では GPT, GOT との相関係数がおおよそ 0.75, 0.79 と高い値をとったが lactate dehydrogenase (LDH), alphafetoprotein (AFP) とは相関を認めなかった。また転移性肝腫瘍においてはいずれも有意の相関を示さなかった。

3.3.4 急性肝炎発症経過における血清 cationic GST 値の変動

急性肝炎における血清 cationic GST 値の変動について血清 GPT, GOT と比較をした。輸血を受けた患者 83 例を対象に輸血時を第 1 日目として 2 日～3 日間隔で採血し、急性肝障害を呈した症例について発症前、発症後にわたり cationic GST を測定した。83 例中 10 例 (12%) に急性の肝障害が出現し、このうち 7 例が吉利

Table 5 Summary of 10 cases of post-transfusion hepatitis.

Name	Age	Sex	Diagnosis	Blood transfusion (ml)	Incubation period (days)	Total Bilirubin (mg/dl)	Maximum GPT (IU/l)	Maximum GOT (IU/l)	HBs Ag	HBs Ab	HBc Ab	Maximum cationic GST (ng/ml)
Case 1 S.K	54	F	Meningioma	400	43	1.0	170	130	-	-	-	32.5
Case 2 H.T	71	M	Esophagus cancer	1,400	28	1.2	151	140	-	-	-	33.0
Case 3 K.K	41	M	Mitral valve regurgitation	1,500	26	1.6	212	129	-	-	-	28.0
Case 4 M.A	46	M	Esophagus cancer	1,400	28	1.0	135	130	-	+	+	52.5
Case 5 S.S	58	M	Mitral valve stenosis	2,400	40	1.6	279	199	-	-	-	65.0
Case 6 K.Y	47	F	Pituitary tumor	700	34	1.8	311	301	-	-	-	132.0
Case 7 T.T	51	F	Mitral valve stenosis	1,200	44	1.5	282	252	-	-	-	92.0
Case 8 E.S	50	M	Aortic valve regurgitation	3,000	68	1.5	254	240	-	-	-	110.0
Case 9 K.N	67	M	Cerebral aneurysm	700	34	2.6	324	281	-	-	-	86.0
Case 10 M.N	63	F	Lung cancer	1,000	30	1.8	302	286	-	-	-	130.0
Mean				1,370	37.5	1.6	242	208.8				76.1

HBsAg was measured by reversed passive hemagglutination. HBsAb was measured by passive hemagglutination. HBcAb was measured by radioimmunoassay.

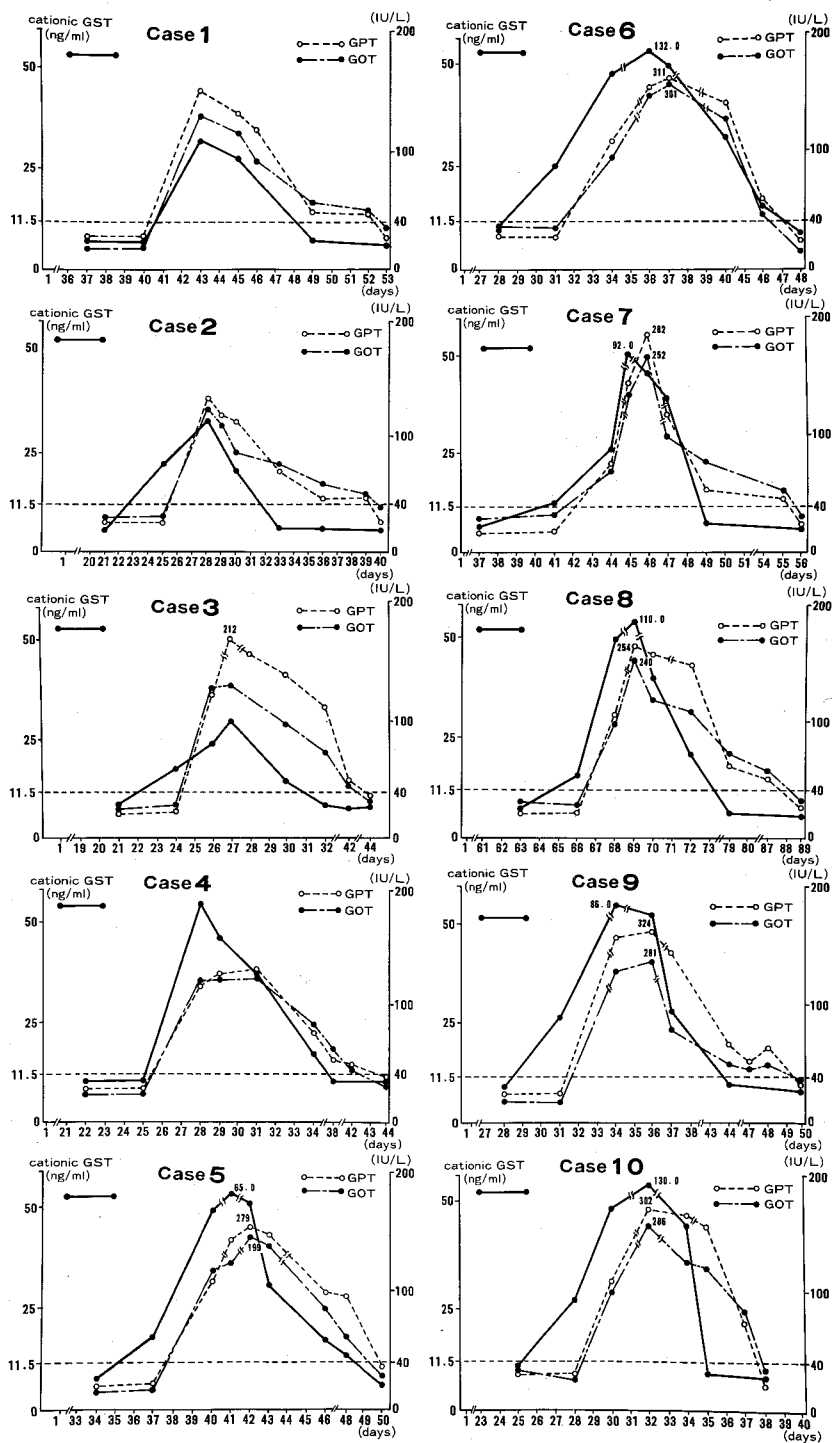


Fig. 12 Serial change of serum cationic GST, GPT and GOT in 10 cases of post-transfusion hepatitis. The patients were given blood transfusions on the first day. The dotted lines indicate the upper limit of normal values of cationic GST, GPT and GOT.

らの診断基準を満たす輸血後肝炎で、3例がその疑診例であった。Table 5に示すように各症例の輸血量はCase 1の400 mlからCase 8の3,000 mlにわたり、平均1,370 mlであった。また輸血時より肝炎発症までの潜伏期は最も短いものでCase 3の26日、最も長いのはCase 8の68日で平均37.5日であった。黄疸を呈したものはCase 9のみで、GPTはCase 2の151 IU/lからCase 9の324 IU/lにわたり平均242 IU/l。GOTはCase 3の129 IU/lからCase 6の301 IU/lにわたり平均208.8 IU/lであった。HBsAgは全例が陰性で、Case 4もHBcAbの有意な上昇を認めず、また全例がアルコールや起因薬剤の服用などの原因を否定できることから非A非B型の輸血後肝炎と考えられた。

これらの症例の発症前、発症後にわたる血清 cationic GST 値の変動を検討したが、Fig. 12に示すようにCase 1, 4を除く8例で血清 cationic GST はGPTより2日～3日先行して正常値を越え、またCase 5, 6を除く8例でもGPTに先行して正常値へ回復した。特に回復の場合、Case 1では4日間、Case 2では7日間、Case 3では12日間、Case 4では6日間、Case 7では7日間、Case 8では10日間、Case 9では6日間、Case 10では3日間早く回復し、8例の平均は6.8日間であった。なおこの経過中GOTはGPTに平行して変動していた。またGPTと血清 cationic GSTのピークの離開が、Case 4, 5, 6, 7, 9の5例にみられた。

4 考 察

これまで血中の cationic GST の濃度は、CDNBをはじめとする種々の親電子性化合物とGSHの二者を基質として、そのGSH抱合活性を測定することにより定量されてきた^{13,23)}。しかし cationic GSTには数種の isozyme(ヒトでは5種⁶⁾、ラットでは6種⁷⁾)が存在し、これらがCDNBに対して同等の基質特異性を有してはいないこと⁶⁾、また正常人血中に微量に存在する cationic GSTを検出するには感度が不十分であること¹³⁾など本法によって血中GSTを測定する際の問題点が種々指摘されてきた。

Bass *et al.*¹⁴⁾、Arias *et al.*¹⁵⁾は初めてラットの cationic GSTのRIA法を開発し、血中での本蛋白の微量定量化に成功した。さらに彼らは実験的肝障害ラットの血中 cationic GSTが上昇することを見出し¹⁴⁾、ヒトにおいても肝細胞障害の指標となりうる可能性を示唆した。しかし、これまでヒトの cationic GSTについて実際RIAを確立した報告は見あたらない。そこで本研究ではヒト肝より cationic GSTを精製しRIA法

を確立することとした。

まず免疫抗原ならびに標準蛋白として用いる cationic GSTの抽出法を検討した。従来 cationic GSTの抽出法としては、①イオン交換体とゲル濾過法を組み合わせた方法⁷⁾、②イオン交換体と等電点電気泳動法を組み合わせた方法²⁴⁾などが報告されてきたが、いずれも各抽出過程での大量の蛋白変性、沈殿により収量の低下が避けられず、GST活性の回収率は6～8%程度であった。Inoue *et al.*¹⁶⁾はSephrose 6-BにL-LysineをスペーサーとしてGSHを固相化させたGSHアフィニティクロマト法を作製し、ラット肝より cationic GSTを高純度で抽出しえたと報告した。本研究ではInoue *et al.*の方法により作製したGSHアフィニティクロマト法とイオン交換体、ゲル濾過を組み合わせヒト肝より cationic GSTの抽出を試み10%以上の回収率を得た。

なお前述したようにヒトの cationic GSTには5種の isozymeが存在するが、それらはすべて抗原性が一致しているために⁶⁾本研究では特に分画することなくRIAの抗原として使用した。

RIAの基礎的検討では標準曲線は5～1,000 ng/mlまで広い範囲で測定可能であり、さらにIntraassayのC. V.は10%以下、InterassayのC. V.は15%以下と満足すべき再現性が得られた。回収試験では、その平均回収率が93.3%と良好であり、これらの結果から本研究のRIAは充分臨床応用にたえうるものと考えられた。

血清 cationic GST値測定成績についてであるが、健康人の平均は 7.96 ± 1.80 ng/mlで性差を認めなかった。年齢別の検討でも推計学的な有意差は認めなかった。種々の肝疾患についてみると劇症肝炎をはじめ急性肝炎、慢性肝炎の増悪期では血清 cationic GST値が高値となり、肝細胞障害の程度を鋭敏に反映していると思われる。この事は急性肝炎や慢性活動性肝炎などの肝細胞障害時に cationic GSTが、GPT、GOTとよく相関する事実から裏づけられ、逸脱酵素の一つとして考えることができよう。

ところで同じ肝逸脱酵素であっても肝障害の初期や治癒期に諸酵素の変動が必ずしも時を一にしないことが知られている。本研究において、輸血後肝炎患者を対象に肝炎の発症経過における cationic GSTを測定したところ発症時ならびに治癒期にはGPT、GOTの変動に先がけて上昇し、あるいは先がけて低下する傾向がみとめられた。血中 cationic GSTが、GPT、GOTに比べ早期に上昇する理由については、すでにTakeda

*et al.*²⁵⁾ は遊離肝細胞を用い LDH, GPT, GOT などの各種逸脱酵素の肝細胞膜透過性の違いが出現時期の差を反映することを示唆しているが, cationic GST の場合にもトランスアミナーゼより膜透過性が高いという可能性も考えられよう. また cationic GST の測定法の感度がトランスアミナーゼの測定法に比べ高いために微量の上昇を初期に検出した可能性も否定できない. 早期に低下する原因については Stein *et al.*²⁶⁾ がラットを用いておこなった実験結果から cationic GST の血中半減期が 2.3 日であるのに対しトランスアミナーゼのそれが 6.3 日と比較的長いことから両者のクリアランスの差異が表現されたものと考えられる. いずれにしてもこのように cationic GST が GPT, GOT に先がけて上昇し, また下降するという事実は輸血後肝炎ばかりでなく他の肝障害, ことに劇症肝炎の発症ならびに治癒経過をいち早く把握するのに, より早期に変化のあらわれる cationic GST の測定が有意義であることを示唆している.

肝癌の血清 cationic GST 値は平均 54.4 ng/ml, 転移性肝腫瘍では 21.9 ng/ml と健常人より高値を示した. 肝癌での血中 cationic GST が上昇する機序については Arias *et al.*¹⁵⁾ により 3'-methyl-4-dimethyl aminoazobenzene (3'-Me-DAB) ラット肝癌移植マウスモデルの血中にラット cationic GST が増加することから, 肝癌組織由来の可能性が示唆されている. われわれの症例においても肝癌に由来する cationic GST が血中に増加していることは十分に考えられるが, 同時に腫瘍細胞の浸潤による正常肝細胞の崩壊を合併している可能性は否定できない. 肝癌の腫瘍マーカーとして本蛋白を評価するために今後の慎重な検討が必要と思われる.

5 結 論

ヒト肝より cationic GST を抽出し 2 抗体法による RIA 法を開発, その基礎的検討にもとづき各種肝疾患における血清 cationic GST 値測定の臨床的意義について検討した.

1) イオン交換クロマト法, ゲル濾過法, GSH-Lys-Sepharose アフィニティクロマト法により精製 cationic GST を得, これを家兎に免疫して特異抗血清を得た.

2) 上記抗血清を使用して 2 抗体法により RIA 法を確立した. その測定感度は 5~1,000 ng/ml で, Intra-assay, Interassay, 回収試験ともに十分な再現性が得られた.

3) 本法を用いて測定した健常者の cationic GST

値は 7.96 ± 1.80 ng/ml であり, 肝疾患では劇症肝炎, 急性肝炎, 慢性活動性肝炎で有意な高値を認めた.

4) これらの疾患や肝細胞癌では血中本酵素の濃度は血清 GPT 値, GOT 値とよく相関を示した.

5) 輸血後肝炎経過中に cationic GST は, GPT, GOT よりも早期に血中で上昇し早期に下降した. この事より血清 cationic GST の測定は輸血後肝炎ばかりでなく他の急性肝障害ことに劇症肝炎での予後判定にも鋭敏なパラメーターになりうるものと考えられた.

6) 肝細胞癌における血清 cationic GST 値は健常人より有意に上昇したが, その機序は現在のところ不明で腫瘍マーカーとして評価をするためには今後の慎重な検討が必要かと思われる.

稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜った本学内科学第 4 講座漆崎一朗教授, 研究に際して直接御指導をいただいた本講座の新津洋司郎助教授, 高後裕講師に深謝致します.

文 献

1. Arias, I. M., Fleischer, G., Kirsh, R., Mishkin, S. and Gatmaitan, G.: 11. On the structure, regulation and function of ligandin. Arias, I. M. and Jakoby, W. B. ed. Glutathione: Metabolism and Function.: 175-188, Raven Press, New York (1976).
2. Levi, A. J., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: Two hepatic cytoplasmic protein functions, Y and Z, and their possible role in hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. J. Clin. Invest. 48, 2151-2167 (1969).
3. Kamisaka, K., Listowsky, I., Gatmaitan, Z. and Arias, I. M.: Interactions of bilirubin and other ligands with ligandin. Biochemistry 14, 2175-2180 (1975).
4. Morey, K. S. and Litwack, G.: Isolation and properties of cytosol metabolite binding proteins of rat liver cytosol. Biochemistry 8, 4813-4821 (1969).
5. Habig, W., Pabst, M., Fleischer, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M. and Jakoby, W. B.: The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3879-3883 (1974).
6. Kamisaka, K., Habig, W. H., Ketley, N., Arias, I. M. and Jakoby, W. B.: Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. Eur. J. Biochem. 60, 153-161 (1975).

7. Jakoby, W. B., Habig, W. H., Keen, J. H., Ketley, J. N. and Pabst, M. J.: 12. Glutathione S-transferases; Catalytic aspects, In: Arias, I.M. and Jakoby, W. B. ed, Glutathione; Metabolism and Function. 189-211, Raven Press, New York (1976).
 8. Warholm, M., Guthenberg, C., Mannervik, B., Bahr, C. and Glaumann, H.: Identification of a new glutathione S-transferase in human liver. *Acta Chem. Scand.* [B] **34**, 607-610 (1980).
 9. Awasti, Y. C., Dao, D. and Saneto, R. P.: Interrelationship between anionic and cationic forms glutathione S-transferases of human liver. *Biochem. J.* **191**, 1-10 (1980).
 10. Warholm, M., Guthenberg, C., Mannervik, B., Pacifici, G. M. and Rane, A.: Glutathione S-transferases in human fetal liver. *Acta Chem. Scand.* [B] **35**, 225-227 (1981).
 11. Klaassen, C. D.: Biliary excretion of drugs: Role of ligandin in newborn immaturity and in the action of microsomal enzyme inducers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **195**, 311-319 (1975).
 12. Fleischer, G. M., Kamisaka, G., Gattam, Z. and Arias, I. M.: Immunologic studies of rat and human ligandin. Glutathione; Metabolism and Function. 259-265, Raven Press, New York (1976).
 13. Adachi, Y., Horii, K., Takahashi, Y., Tanihata, M., Ohba, Y. and Yamamoto, T.: Serum glutathione S-transferase activity in liver diseases. *Clin. Chim. Acta* **106**, 243-255 (1980).
 14. Bass, N. M., Kirsh, R. E., Tuff, S. A., and Saunders, S. J.: Radioimmunoassay of ligandin. *Biochim. Biophys. Acta* **494**, 131-143 (1977).
 15. Arias, I. M., Ohmi, N. and Bhargava, M. M.: Ligandin subunits and hepatocellular carcinoma in man and rat. *Trans. Assoc. Am. Physicians.* **92**, 113-120 (1979).
 16. Inoue, M., Hara, M., Nagashima, F., Matsui, S., Mitsuyasu, N., and Morino, Y.: Affinity chromatography of hepatic glutathione S-transferases on ω -aminoalkyl sepharose derivatives of glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* **659**, 362-369 (1981).
 17. Maizel, J. V. Jr.: 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Methods Virol.* **5**, 179-246 (1973).
 18. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, B. and Randal, R.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 19. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B.: Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **25**, 7130-7139 (1974).
 20. Marcus, D. M. and Zinberg, N.: Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: Results in normal individuals and patients with breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* **55**, 791-795 (1975).
 21. Ouchterlony, O.: In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria, 8th Scandinavian Pathological Congress, 1947. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **25**, 86-191 (1948).
 22. Hunter, W. M.: Radioimmunoassay. In: Weir, D.M. ed.: *Handbook of Experimental Immunology* 2nd ed. 1-36, Blackwell Scientific Pub, Oxford (1973).
 23. Adachi, Y., Horii, K., Suwa, M., Tanihata, M., Ohba, Y. and Yamamoto, T.: Serum glutathione S-transferase in experimental liver damage in rats. *Gastroenterol. Jpn.* **16**, 129-133 (1981).
 24. Habig, W. H., Kamisaka, K., Ketley, J. N., Pabst, M. J., Arias, I. M. and Jakoby, W. B.: The human hepatic glutathione S-transferases, In: Arias, I. M. and Jakoby, W. S. ed, Glutathione; Metabolism and Function. 225-242, Raven Press, New York (1976).
 25. Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inoue, H.: The Biochemistry of animal cells. *J. Biol. Chem.* **239**, 3590-3596 (1964).
 26. Stein, L. B., Mishkin, S., Fleischer, G., Gattam, Z. and Arias I. M.: Effect of fasting on hepatic ligandin, protein, and organic anion transfer from plasma in rats. *Am. J. Physiol.* **231**, 1371-1376 (1976).
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学内科学第4講座 佐藤鉄典